

English Abstract for European Patent Publication No.: 0 219 874:

?s pn=ep 219874

S3 1 PN=EP 219874

?t s3/9/1

3/9/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI

(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007117131

WPI Acc No: 1987-117128/198717

XRAM Acc No: C87-048664

Activating recombinant non-glycosylated tissue plasminogen activator - by solubilising under reducing conditions then oxidative reactivation in presence of glutathione

Patent Assignee: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (BOEF); FISCHER S (FISC-I); ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (HOFF)

Inventor: FISCHER S; MATTES R; RUDOLPH R; MATES R; RUDOLF R; RAINER R

Number of Countries: 029 Number of Patents: 041

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3537708	A	19870423	DE 3537708	A	19851023	198717 B
EP 219874	A	19870429	EP 86114731	A	19861023	198717
WO 8702673	A	19870507	WO 86EP610	A	19861023	198719
PT 83609	A	19870529				198725
ZA 8608012	A	19870422	ZA 86608012	A	19861022	198730
AU 8665993	A	19870519				198732
HU 43643	T	19871130				198751
JP 62502895	W	19871119	JP 86505882	A	19861023	198801
EP 253823	A	19880127	EP 86906320	A	19861023	198804
DK 8703203	A	19870623				198809
FI 8702753	A	19870622				198814
DD 260517	A	19880928				198908
AU 8941321	A	19900104				199007
EP 393725	A	19901024				199043
SU 1607689	A	19901115	SU 4202987	A	19870622	199131
ES 2020498	A	19910816				199137
IL 80325	A	19920621	IL 80325	A	19861015	199234
JP 4218387	A	19920807	JP 86505882	A	19861023	199238
			JP 9179762	A	19861023	
DE 3537708	C2	19930708	DE 3537708	A	19851023	199327
FI 9303868	A	19930903	WO 86EP610	A	19861023	199347
			FI 872753	A	19870622	
			FI 933868	A	19930903	
EP 219874	B1	19931215	EP 86114731	A	19861023	199350
DE 3689404	G	19940127	DE 3689404	A	19861023	199405
			EP 86114731	A	19861023	
CA 1329157	C	19940503	CA 521121	A	19861022	199423
ES 2061434	T3	19941216	EP 86114731	A	19861023	199505
FI 94050	B	19950331	WO 86EP610	A	19861023	199518
			FI 872753	A	19870622	
JP 95028745	B2	19950405	JP 86505882	A	19861023	199518
			WO 86EP610	A	19861023	
IE 62634	B	19950222	IE 862683	A	19861010	199519
US 5453363	A	19950926	US 8776207	A	19870727	199544

			US 90498500	A	19900323	
			US 92942370	A	19920909	
			US 94206044	A	19940302	
FI 95578	B	19951115	WO 86EP610	A	19861023	199550
			FI 872753	A	19870622	
			FI 933868	A	19930903	
EP 393725	B1	19951213	EP 90109721	A	19861023	199603
DE 3650449	G	19960125	DE 3650449	A	19861023	199609
			EP 90109721	A	19861023	
CZ 8607526	A3	19960117	CS 867526	A	19861017	199610
JP 96024594	B2	19960313	JP 86505882	A	19861023	199615
			JP 9179762	A	19861023	
ES 2020498	T3	19960401	EP 90109721	A	19861023	199621
CZ 280727	B6	19960417	CS 867526	A	19861017	199623
CZ 280848	B6	19960417	CZ 94460	A	19861017	199623 N
CZ 9400460	A3	19960417	CZ 94460	A	19861017	199623 N
SK 278317	B6	19961002	CS 867526	A	19861017	199649
SK 8607526	A3	19961002	CS 867526	A	19861017	199649
US 5593865	A	19970114	US 8776207	A	19870727	199709
			US 90498500	A	19900323	
			US 92942370	A	19920909	
			US 94206044	A	19940302	
			US 95457845	A	19950601	
DK 200001897	A	20001218	DK 20001897	A	20001218	200108

Priority Applications (No Type Date): DE 3537708 A 19851023; WO 86EP610 A 19861023; CZ 94460 A 19861017

Cited Patents: 19Jnl.Ref; A3...8806; EP 114506; JP 51035481; JP 60051119; No-SR.Pub; US 4530787; WO 8403711; US 4432895

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

DE 3537708	A		7		
------------	---	--	---	--	--

EP 219874	A	G			
-----------	---	---	--	--	--

Designated States (Regional): ES GR

WO 8702673	A	G			
------------	---	---	--	--	--

Designated States (National): AU DK FI HU JP KR SU US

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT NL SE

EP 253823	A	G			
-----------	---	---	--	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

EP 393725	A				
-----------	---	--	--	--	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

IL 80325	A			C07K-003/12	
----------	---	--	--	-------------	--

JP 4218387	A		13	C12P-021/00	Div ex application JP 86505882
------------	---	--	----	-------------	--------------------------------

DE 3537708	C2		7	C12N-009/48	
------------	----	--	---	-------------	--

FI 9303868	A			C12N-000/00	Div ex application FI 872753
------------	---	--	--	-------------	------------------------------

EP 219874	B1	G	12	C07K-003/08	
-----------	----	---	----	-------------	--

Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

DE 3689404	G			C07K-003/08	Based on patent EP 219874
------------	---	--	--	-------------	---------------------------

CA 1329157	C			C12N-009/64	
------------	---	--	--	-------------	--

ES 2061434	T3			C07K-003/08	Based on patent EP 219874
------------	----	--	--	-------------	---------------------------

FI 94050	B			C07K-001/00	Previous Publ. patent FI 8702753
----------	---	--	--	-------------	----------------------------------

JP 95028745	B2		11	C12N-015/09	Based on patent JP 62502895
-------------	----	--	----	-------------	-----------------------------

Based on patent WO 8702673

IE 62634	B			C07K-003/08	
----------	---	--	--	-------------	--

US 5453363	A		19	C07K-014/745	CIP of application US 8776207
					Cont of application US 90498500
					Cont of application US 92942370

FI 95578	B	C07K-001/00	Div ex application FI 872753 Previous Publ. patent FI 9303868
EP 393725	B1 G 18	C07K-001/113	
Designated States (Regional): AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE			
DE 3650449	G	C07K-001/113	Based on patent EP 393725
CZ 8607526	A3	A61K-038/46	
JP 96024594	B2	16 C12P-021/00	Div ex application JP 86505882 Based on patent JP 4218387
ES 2020498	T3	C07K-001/113	Based on patent EP 393725
CZ 280727	B6	A61K-038/46	Previous Publ. patent CZ 8607526
CZ 280848	B6	A61K-038/46	Previous Publ. patent CZ 9400460
CZ 9400460	A3	A61K-038/46	
SK 278317	B6	C07K-001/107	Previous Publ. patent SK 8607526
SK 8607526	A3	C07K-001/107	
US 5593865	A	18 C12P-001/04	Cont of application US 8776207 Cont of application US 90498500 Cont of application US 92942370 Cont of application US 94206044 Cont of patent US 5453363
DK 200001897	A	C07K-001/113	

Abstract (Basic): DE 3537708 A

Method for activating non-glycosylated tissue plasminogen activator (t-PA) after its expression in prokaryotic cells comprises cell lysis; solubilisation under denaturing and reducing conditions, and reactivation under oxidising conditions in presence of reduced and oxidised glutathione (G5H, G55G).

The new feature is that in the last stage is at pH 9-12 (pref. 9.5-11) with G5H and G55G concns. 0.1-20, pref. 0.2-10, mM and 0.01-3, pref. 0.5-1, mM, respectively, and with a non-denaturing concn. of the denaturing agent. Esp. the method is applied to t-PA expressed in E.coli and P. putida.

The denaturing agent is pref. arginine, guanidine hydrochloride (both at 0.1-1, esp. 0.25-0.75, mM) or urea, at 0.5-4 (esp. 1-3.5) M in the last stage.

USE/ADVANTAGE - Complete activation of t-PA is achieved and the capacity for stimulation (by cyanogen bromide fibrin cleavage (products) exceeds that of natural t-PA by 10-50 times.

Dwg.0/2

Abstract (Equivalent): EP 393725 B

Process for the activation of gene-technologically produced, heterologous, disulphide bridge-containing eukaryotic proteins after expression in prokaryotes by cell digestion, solubilisation under denaturing and reducing conditions and reactivation under oxidising conditions in the presence of GSH/GSSG, characterised in that, in the step of the reactivation, one works at a pH value of 8 to 12, a GSH concentration of 0.1 to 20 mmol/l, a GSSG concentration of 0.01 to 3 mmol/l and with a non-denaturing concentration of the denaturing agent and that, in the reactivation step, as denaturing agent, one uses arginine and/or at least one compound of the general formula R²-CO-NRR, (I), whereby R and R¹ signify H or alkyl with 1 to 4 C-atoms and R^s signifies H or NHR¹ or alkyl with 1 to 3 C-atoms with the proviso that R and R¹ are not simultaneously H.

Dwg.0.2

Abstract (Equivalent): US 5593865 A

A process for activating a heterologous, disulphide bridge containing protein expressed in a prokaryotic cell, comprising:

(i) expressing said heterologous, disulphide bridge containing protein in a prokaryote to form refractile bodies;

(ii) digesting prokaryotic cells which contain said refractile bodies;

(iii) solubilizing said refractile bodies under conditions which reduce and denature said molecule; and

(iv) oxidizing said solubilized, reduced and denatured molecule by contact with (a) reduced glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) at a pH of from 8 to 12, wherein GSH is at a concentration of from 0.01 to 20 mmol/liter, GSSG is at a concentration of from 0.01 to 3 mmol/liter, and (b) a denaturing agent present at a non-denaturing concentration, wherein said denaturing agent is selected from the group consisting of arginine, guanidine hydrochloride, and a compound of formula R2-CO-NRR1, wherein R and R1 are H or C1-C4 alkyl, and R2 is H, NHR1, or C1-C3 alkyl.

Title Terms: ACTIVATE; RECOMBINATION; NON; GLYCOSYLATED; TISSUE; PLASMINOGEN; ACTIVATE; SOLUBLE; REDUCE; CONDITION; OXIDATION; REACTIVATION; PRESENCE; GLUTATHIONE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-038/46; C07K-001/00; C07K-001/107; C07K-001/113; C07K-003/08; C07K-003/12; C12N-000/00; C12N-009/48; C12P-001/04; C12P-021/00

International Patent Class (Additional): A61K-037/47; A61K-037/54; A61K-038/48; C07K-001/14; C07K-003/28; C07K-013/00; C07K-014/00; C07K-014/565; C07K-014/745; C07K-015/00; C07K-015/04; C07K-015/26; C07K-016/00; C12N-009/64; C12N-009/72; C12N-015/00; C12N-015/09; C12N-015/12; C12N-015/20; C12N-015/58; C12N-015/63; C12P-021/02; C12R-001-19; C12R-001-40; C12P-021/00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-B02C; D05-A02

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M720 M903 N131 N135 N422 Q233 V500 V540

Chemical Fragment Codes (M2):

02 H1 H100 H181 H4 H498 H9 J0 J014 J1 J172 J3 J372 M280 M311 M312 M313 M321 M332 M342 M343 M349 M381 M393 M416 M430 M620 M782 M903 M904 M910 V901 V902 V911 V921 R00297-U

03 H1 H100 H181 J0 J011 J1 J171 K0 L2 L250 M280 M314 M321 M332 M343 M349 M381 M391 M416 M430 M620 M782 M800 M903 M904 M910 R04093-M

04 K0 L2 L250 M280 M320 M416 M430 M620 M640 M782 M903 M904 M910 R10859-M

05 K0 L4 L432 M280 M320 M416 M430 M620 M782 M903 M904 M910 R00123-U

06 H1 H101 H182 J0 J014 J173 J3 J373 M280 M311 M312 M313 M322 M332 M342 M343 M349 M381 M393 M416 M430 M620 M782 M903 M904 V901 V902 V911 V921 R03944-M

Derwent Registry Numbers: 0123-U; 0297-U; 0956-U; 1661-U

Specific Compound Numbers: R00297-U; R04093-M; R10859-M; R00123-U; R03944-M

⑫ **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

⑬ Anmeldenummer: 86114731.2

⑭ Int. Cl.⁴: C07K 3/08, C07K 13/00, C12P 21/02, C12N 9/72

⑮ Anmeldetag: 23.10.86

⑯ Priorität: 23.10.85 DE 3537708

⑰ Veröffentlichungstag der Anmeldung: 29.04.87 Patentblatt 87/18

⑱ Benannte Vertragsstaaten: DE FR

⑲ Anmelder: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
 Patentabteilung, Abt. E Sandhofer Strasse
 112-132 Postfach 31 01 20
 D-6800 Mannheim 31 Waldhof(DE)

⑳ Erfinder: Rudolph, Rainer, Dr.
 Unterislinger Weg 21
 D-8400 Regensburg(DE)
 Erfinder: Fischer, Stephan, Dr.
 Moosstrasse 27
 D-8120 Weilheim(DE)
 Erfinder: Mattes, Ralf, Dr.
 Eyacher Strasse 37
 D-8125 Oberhausen(DE)

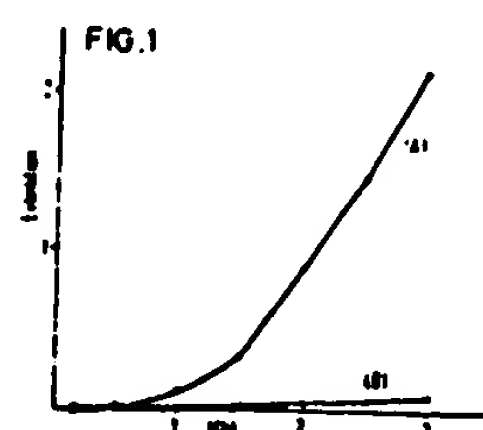
㉑ Vertreter: Welckmann, Heinrich, Dipl.-Ing. et al
 Patentanwälte Dipl.-Ing. H. Welckmann
 Dipl.-Phys. Dr. K. Fincke Dipl.-Ing.
 F. A. Welckmann Dipl.-Chem. B. Huber Dr.-Ing.
 H. Liska Dipl.-Phys. Dr. J. Prechtel Postfach
 860820
 D-8000 München 86(DE)

need to locate
 abstract

㉒ Verfahren zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken aufweisenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten.

㉓ Zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten durch Zellaufschluß, Solubilisierung unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen und Aktivierung unter oxidierenden Bedingungen in Gegenwart von GSH/GSSG arbeitet man entweder in der Stufe der Aktivierung bei einem pH-Wert von 9 bis 12, eine GSH-Konzentration von 0,1 bis 20 mmol/l, einer GSSG-Konzentration von 0,01 bis 3 mmol/l und mit einer nicht denaturierenden Konzentration des Denaturierungsmittels oder indem man die Reduktions-/Denaturierungsmittel abtrennt, durch Zugabe von GSSG unter denaturierenden Bedingungen die Thiolgruppen der Proteine in die gemischten

Disulfide von Protein und Glutathion überführt, in der Stufe der Aktivierung bei einem pH-Wert von 7 bis 10,5 eine GSH-Konzentration von 0,5 bis 5 mmol/l und eine nicht denaturierende Konzentration des Denaturierungsmittels einstellt. Das Verfahren ist insbesondere für t-PA und Interferon β wertvoll.



Verfahren zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken aufweisenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten.

Bei der Expression von heterologen Proteinen in Prokaryonten bilden diese Proteine in den Wirtszellen oft inaktive, schwer lösliche Aggregate (sog. "refractile bodies"), die außerdem noch mit Proteinen der Wirtszellen verunreinigt sind. Es wird vermutet, daß die Bildung solcher "refractile bodies" eine Folge der bei der Expression entstehenden hohen Proteinkonzentration in der Zelle ist. Es ist bekannt, daß bei der Bildung von großen Enzymmengen in der Zelle die Aggregation der Enzyme zu unlöslichen, hochmolekularen, meist inaktiven Partikeln erfolgt. Bevor solche Proteine, z. B. für therapeutische Zwecke, verwendet werden können, müssen sie demzufolge gereinigt und in ihre aktive Form überführt werden.

Nach bekannten Verfahren kann eine Reaktivierung derartiger, als Aggregate vorliegender Proteine in mehreren Schritten erfolgen (vgl. z. B. R. Jaenicke, FEBS Federation of European Biochemical Societies, Vol. 52 (1979) 187 bis 198; R. Rudolph et al., Biochemistry 18 (1979) 5572 bis 5575):

Im ersten Schritt wird eine Solubilisierung durch Zugabe von starken Denaturierungsmitteln, beispielsweise Guanidin-Hydrochlorid oder Harnstoff in hoher Konzentration oder durch Zugabe von stark sauren Agentien, beispielsweise Glycin/Phosphorsäure-Mischungen erreicht. Als weitere Hilfsstoffe haben sich reduzierende SH-Reagentien (z. B. Dithioerythritol, DTE) und EDTA, beispielsweise bei der Renaturierung von LDH, bewährt. Sofern das Protein durch Proteine der Wirtszelle verunreinigt ist, schließt sich als nächster Schritt eine Reinigung mit an sich bekannten und üblichen Methoden, z. B. Gel oder Ionenaustauschchromatographie, an. Anschließend wird stark verdünnt, damit die Konzentration des Denaturierungsmittels geringer wird. Bei Verwendung von Guanidin-Hydrochlorid wird dabei auf Werte unter 0,5 mol/l verdünnt. Bei Enzymen mit freien SH-Gruppen erwies sich die Zugabe von SH-Gruppenschützenden Agentien als vorteilhaft (vgl. z. B. R. Jaenicke, Journal Polymer Science, Part C 16 - (1967) 2143 bis 2160).

In der EP-A-0114506 werden Verfahren zur Isolierung, Reinigung und Reaktivierung einiger heterologer Expressionsprodukte aus Bakterienkulturen beschrieben; zur Reaktivierung werden die Lösungen der "refractile bodies" in einem starken Denaturierungsmittel a) direkt in eine Lösung in

einem schwächeren Denaturierungsmittel überführt, die dann zur Rückbildung von Disulfidbrücken oxydierenden Bedingungen unterworfen wird; b) das Protein sulfoniert, dann in eine Lösung in einem schwachen Denaturierungsmittel überführt und die S-Sulfonatgruppen durch Behandlung mit einem Sulfhydrylreagens in seiner reduzierten und oxydierten Form, z. B. mit GSH/GSSG, in -S S-Gruppen überführt; oder c) die Lösung in einem schwachen Denaturierungsmittel direkt mit dem Sulfhydryl-Reagens, z. B. mit GSH/GSSG, behandelt. Ein typisches Beispiel, bei dem die oben dargelegten Probleme auftreten, ist t-PA.

Die Hauptkomponente der Proteinmatrix von geronnenem Blut ist polymeres Fibrin. Diese Proteinmatrix wird durch Plasmin gelöst, das aus Plasminogen über Aktivierung durch die sogenannten Plasminogen-Aktivatoren gebildet wird, z. B. durch t-PA (Gewebs-PlasminogenAktivator, tissue-type plasminogen activator). Die enzymatische Aktivität von natürlichem oder aus Eukaryonten gentechnologisch gewonnenem t-PA (katalytische Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin) ist in Abwesenheit von Fibrin oder Fibrinspaltprodukten - (FSP) sehr gering, kann aber in Gegenwart dieser Stimulatoren wesentlich gesteigert werden (um mehr als den Faktor 10). Diese sogenannte Stimulierbarkeit der Aktivität ist ein entscheidender Vorzug von t-PA gegenüber anderen bekannten Plasminogenaktivatoren, wie Urokinase oder Streptokinase (vgl. z. B. M. Hoylaerts et al., J. Biol. Chem. 257 (1982) 2912 bis 2919; Nieuwenhuizen et al., Biochimica et Biophysica Acta 755 (1983) 531 bis 533). Der Faktor der Stimulierbarkeit mit BrCN-Spaltprodukten wird daher in der Literatur verschiedentlich angegeben und mit bis zu 35 beziffert.

Ein t-PA-artiges, nicht glycosyliertes Produkt wird auch in genetisch manipulierten Prokaryonten (nach Einschleusen der c-DNA) gebildet; einem solchen Produkt kommt aber nicht die Stimulierbarkeit der Aktivität eines t-PA aus Eukaryonten zu. Denkbar ist, daß dies darauf zurückzuführen ist, daß die Redoxbedingungen in der Prokaryontenzelle in solcher Weise von der Eukaryontenzelle, aus der das Gen stammt, verschieden sind, daß von Anfang an ein nicht aktives Produkt gebildet wird, was beispielsweise darauf zurückzuführen sein könnte, daß die zahlreichen SS-Brücken, die das natürliche aktive Molekül enthält, in falscher Weise verknüpft oder gar nicht gebildet sind. Für den therapeutischen Einsatz von t-PA ist aber nicht nur die enzymatische Aktivität als solche erforderlich, sondern außerdem auch seine Stimulierbar-

keit. Auf die Tatsache, daß die Prokaryontenzelle vermutlich nicht die richtigen Bedingungen schafft, um die Aktivität von Eukaryontenproteinen in der richtigen Weise auszubilden, wird für andere Substanzen in The EMBO Journal 4, Nr. 3 (1985) 775 bis 780 hingewiesen.

Nach der EP-A-0093639 werden zur Reaktivierung von t-PA die aus *E. coli* erhaltenen Zellpellets in 6 mol/l Guanidin-Hydrochlorid suspendiert, mit Ultraschall behandelt, inkubiert und anschließend vier Stunden gegen eine Lösung aus Tris-HCl (pH = 8,0), Natriumchlorid, EDTA und Tween 80 dialysiert. Nach Dialyse wird zentrifugiert, wobei im Überstand die Plasminogenaktivator-Aktivität zu finden ist. Auf diese Weise renaturierter t-PA ist zwar proteolytisch aktiv, zeigt jedoch keine meßbare Stimulierbarkeit durch BrCN-Spaltprodukte (BrCN-FSP) von Fibrin, gemäß dem in J. H. Verheijen, Thromb. Haemostas., 48, (3), 260 -269 (1982) beschriebenen Verfahren.

Für die Reaktivierung von denaturierten Proteinen ist aus dem Stand der Technik kein allgemein anwendbares Verfahren bekannt; dies gilt ganz besonders für t-PA, weil das native Protein eine sehr komplexe Struktur besitzt; es enthält eine freie Thiolgruppe und 17 SS-Brücken, die theoretisch auf $2,2 \times 10^{28}$ verschiedene Weisen verknüpft werden können, wobei nur eine Struktur dem nativen Zustand entspricht. Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Reaktivierung von t-PA führen zwar zu einem proteolytisch aktiven t-PA, der aber keine meßbare Stimulierbarkeit zeigt; ein Aktivierungsverfahren, welches zu stimulierbarem t-PA führt, ist nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Bereitstellung eines Verfahrens zur vollständigen Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten; diese Aufgabe wird mit dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung gelöst.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten gemäß Patentanspruch 1 durch Zellaufschluß, Solubilisierung unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen und Aktivierung - (Renaturierung) unter oxydierenden Bedingungen in Gegenwart von GSH/GSSG, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man in der Stufe der Aktivierung bei einem pH-Wert von 9 bis 12, einer GSH-Konzentration von 0,1 bis 20 mmol/l, einer GSSG-Konzentration von 0,01 bis 3 mmol/l, und mit einer nicht denaturierenden Konzentration des Denaturierungsmittels arbeitet.

Bevorzugte Ausgestaltungen dieses Verfahrens sind Gegenstand der Unteransprüche.

Als Denaturierungsmittel kann in der Regel ein für Aktivierungen unter oxidierenden Bedingungen üblicherweise verwendetes Denaturierungsmittel oder Arginin eingesetzt werden; bevorzugt wird unter den bekannten Denaturierungsmitteln Guanidin-Hydrochlorid oder Hamstoff oder dessen Derivate verwendet. Außerdem hat sich Arginin als geeignet erwiesen. Ferner können Gemische dieser Denaturierungsmittel verwendet werden. Vorzugsweise wird diese Aktivierungsstufe auch in Gegenwart eines Fremdproteins durchgeführt; als solches eignet sich in der Regel jedes Fremdprotein, solange es nicht proteolytisch wirksam ist; vorzugsweise wird Rinderserumalbumin (BSA), verwendet, z. B. in einer Menge von 1 bis 3 mg/ml. Der Zusatz von BSA bewirkt eine leichte Erhöhung der Ausbeute und Stabilisierung des Proteins (wahrscheinlich durch Schutz vor Oberflächendenaturierung und/oder proteolytischem Abbau).

Die übrigen Verfahrensbedingungen können den für Reaktivierungsstufen aus dem Stand der Technik bekannten und üblichen Bedingungen entsprechen. Die Dauer der Aktivierung (Inkubation) beträgt vorzugsweise 20 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur. Die Halbwertszeit der Aktivierung liegt in Gegenwart von 0,5 mmol/l reduziertem (GSH) und oxydiertem (GSSG) Glutathion bei etwa 10 bis 15 Stunden bei 20°C. Bei einer längeren Inkubation (48 Stunden) unter Reoxidationsbedingungen nimmt die Stimulierbarkeit durch CNBr-FSP in der Regel ab. Die Aktivierungsstufe wird vorzugsweise in Gegenwart von EDTA durchgeführt, wobei die zweckmäßigste Konzentration ca. 1 mmol/l EDTA beträgt.

Die der Aktivierungsstufe - (Reoxidation/Aktivierung) vorausgehenden und nachfolgenden Verfahrensschritte, wie Zellaufschluß, Solubilisierung (Solubilisierung/Reduktion) und gegebenenfalls eine oder mehrere der Aktivierungsstufe vorausgehende und/oder nachfolgende Reinigungsoperationen können nach aus dem Stand der Technik, z. B. aus der EP-A-0114506, EP-A-0093619, für derartige Verfahren bekannten und üblichen Methoden durchgeführt werden; für ein im Hinblick auf Ausbeute und Aktivierung optimales Ergebnis kann es aber zweckmäßig sein, einzelne oder alle Verfahrensschritte unter Berücksichtigung einer oder mehrerer der hier erläuterten Verfahrensausgestaltungen durchzuführen. Insbesondere ist es auch möglich, die erfindungsgemäße Stufe der Aktivierung in dem nach dem Aufschluß erhaltenen Gemisch ohne vorhergehende Denaturierung und/oder Reduktion durchzuführen, allerdings bei niedriger Ausbeute. Die Expression wird in Prokaryonten, vorzugsweise in *P. putida*, und insbesondere in *E. coli*, durchgeführt. Das erfindungsgemäße Verfahren ist je-

doch genauso geeignet, wenn in anderen Prokaryonten (z. B. Bacilli) exprimiert wird.

Der Zellaufschluß kann durch hierfür übliche Methoden durchgeführt werden, z. B. mittels Ultraschall, Hochdruckdispersion oder Lysozym; er wird vorzugsweise in einer zur Einstellung eines neutralen bis schwach sauren pH-Wertes geeigneten Pufferlösung als Suspensionsmedium durchgeführt, wie z. B. in 0,1 mol/l Tris-HCl. Nach dem Zellaufschluß werden die unlöslichen Bestandteile ("refractile bodies") in beliebiger Weise abgetrennt, vorzugsweise durch Abzentrifugieren bei höheren g-Zahlen und längerer Zentrifugationszeit oder durch Filtration. Nach dem Waschen mit Agentien, die t-PA nicht stören, fremde Zellproteine jedoch möglichst lösen, z. B. Wasser, Phosphat-Pufferlösung, gegebenenfalls unter Zusatz milder Detergentien wie Triton, wird der Niederschlag - (Pellet) der Solubilisierung - (Solubilisierung/Reduktion) unterworfen. Die Solubilisierung erfolgt vorzugsweise im alkalischen pH-Bereich, insbesondere bei $\text{pH} = 8,6 \pm 0,4$ und in Gegenwart eines Reduktionsmittels aus der Mercaptangruppe und eines Denaturierungsmittels.

Als Denaturierungsmittel können die für Solubilisierungen aus dem Stand der Technik, z. B. aus der EP-A-0114506, bekannten und üblichen Denaturierungsmittel verwendet werden, und insbesondere Guanidin-Hydrochlorid oder Harnstoff. Die Konzentration an Guanidin-Hydrochlorid beträgt zweckmäßigerweise ca. 8 mol/l, die von Harnstoff ca. 8 mol/l. Ebenso können Verbindungen der allgemeinen Formel I eingesetzt werden.

Als Reduktionsmittel aus der Mercaptangruppe kann z. B. reduziertes Glutathion (GSH) oder 2-Mercaptoäthanol verwendet werden, z. B. in einer Konzentration von ca. 50 bis 400 mmol/l und/oder insbesondere DTE (Dithioerythritol) bzw. DTT - (Dithiothreitol), z. B. in einer Konzentration von ca. 80 bis 400 mmol/l. Die Solubilisierung erfolgt zweckmäßigerweise bei Raumtemperatur während einer Dauer (Inkubation) von 1 bis mehreren Stunden, vorzugsweise von zwei Stunden. Zur Verhinderung der Autoxidation des Reduktionsmittels durch Luftsauerstoff kann es auch zweckmäßig sein, EDTA zuzusetzen. Neben der Solubilisierung/Reduktion hat die Solubilisierungsstufe auch einen Reinigungseffekt, da ein Großteil von mit t-PA immunologisch nicht kreuzreagierendem Material (Fremdproteine) nicht in Lösung geht.

Nach der Solubilisierung und vor der Aktivierungsstufe können an sich bekannte und übliche Reinigungsstufen eingeschoben werden; als Reinigungsmethoden kommen z. B. sterische Ausschlusschromatographie (SEC) (in Gegenwart von Guanidin-Hydrochlorid oder Harnstoff) oder Ionenaustauscher (in Gegenwart von Harnstoff oder deren Derivate) in Frage; eine unspezifische Reoxi-

dation kann durch Zusatz eines Reduktionsmittels - (z. B. 2-Mercaptoäthanol) oder durch pH-Werte 4,5 verhindert werden (vgl. z. B. R. Rudolph, Biochem. Soc. Transactions 13 (1985) 308 bis 311). Wenn in der vorausgehenden Solubilisierungsstufe DTE verwendet wurde, muß dieses in einer Reinigungsstufe abgetrennt werden. Die Reinigung kann z. B. durch SEC über Sephadex G 100 in Gegenwart von Guanidin-Hydrochlorid und eines Reduktionsmittels, z. B. von GSH bei einem pH von 1 bis 4 erfolgen (bei diesem Schritt kann eine große Menge des Fremdproteins abgetrennt werden); oder durch Abtrennung der Denaturierungs/Reduktionsmittel durch Entsalzen über Sephadex G 25 in 0,01 mol/l HCl bzw. 0,1 mol/l Essigsäure. Die Abtrennung der Denaturierungs-/Reduktionsmittel ist alternativ durch Dialyse gegen die gleichen Lösungen möglich.

Ein weiterer Reinigungsschritt kann sich an die Reaktivierungsstufe anschließen; eine solche Reinigung erfolgt in der Regel mittels Dialyse, oder auch einer anschließenden Isolierung des aktivierten tPA, beispielsweise durch Affinitätschromatographie, beispielsweise über Lys-Sepharose.

Eine andere Ausführungsform der Erfindung beruht auf der Bildung der gemischten Disulfide von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteinen und Glutathion (im folgenden abgekürzt t-PASSG). Dies kann sowohl die Abtrennung von Fremdproteinen im denaturierten Zustand als auch die weitere Reinigung des nativen Proteins erleichtern. Eine Reinigung nach Modifizierung der Thiolgruppen hat den Vorteil, daß das Protein geschützt gegen Luftoxidation und damit in einem größeren pH-Bereich stabil ist und eine Veränderung der Nettoladung die Reinigung erleichtert. Insbesondere kann durch Ionenaustauscherbehandlung eine Abtrennung vom nicht modifizierten Protein vorteilhaft durchgeführt werden.

Zur Bildung der gemischten Disulfide wurde das dialysierte, reduzierte, von Denaturierungs- und Reduktionsmitteln gereinigte Protein mit einer ein Denaturierungsmittel enthaltenden verdünnten, z.B. 0,2 mol/l, Lösung von GSSG inkubiert. Die Aktivierung erfolgte nach Abtrennung des Denaturierungs- und des Oxidationsmittels bei einem pH-Wert von 7 bis 10,5 einer GSH-Konzentration von 0,5 bis 5 mmol/l und mit einer nicht denaturierenden Konzentration des Denaturierungsmittels.

In allen anderen Reaktionsschritten entspricht die Aktivierung des Proteins über die Bildung der gemischten Disulfide mit GSSG den Ausführungsformen für die Aktivierung des vorher genannten Teils der Erfindung. Bei dieser Ausführungsform liegt das pH-Optimum bei 8,5, die

Ausbeute ist etwa doppelt so hoch und das aktivierte Protein ist im Renaturierungspuffer über längere Zeit stabil.

Erfindungsgemäß gelingt es, t-PA aus Prokaryonten so zu aktivieren, daß nicht nur eine Aktivierung der normalen biologischen Aktivität erreicht, sondern darüberhinaus auch eine Stimulierbarkeit im oben definierten Sinne erreicht wird, welche die Stimulierbarkeit des nativen t-PA weit übersteigt und größer als Faktor 10 ist, ja sogar Faktor 50 übersteigen kann.

Ein weiteres eukaryontisches Protein, das erfindungsgemäß nach Expression in Prokaryonten aktiviert werden kann, ist β -Interferon.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung näher, ohne sie darauf zu beschränken. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich Prozentangaben auf Gewichtsprozent, und Temperaturangaben auf Grad Celsius.

Beispiel 1

a) Präparation der "refractile bodies"

100 g E. coli Zellfeuchtmasse, aufgenommen in 1,5 l, 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5) und 20 mmol/l EDTA wurden homogenisiert (Ultra-Turrax, 10 Sek.) und 0,25 mg/ml Lysozym zugegeben. Nach 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut homogenisiert und auf 3 °C abgekühlt. Der Zellaufschluß wurde durch Hochdruckdispersion - (550 kg/cm²) erreicht. Anschließend wurde mit 300 ml 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5) und 20 mmol/l EDTA nachgespült. Nach Zentrifugation (2 Std. bei 27.000 g, 4 °C) wurde das Pellet in 1,3 l 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5), 20 mmol/l EDTA und 2,5 % Triton-x-100 aufgenommen und homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 Min. bei 27.000 g, 4 °C) wurde das Pellet in 1,3 l 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5), 20 mmol/l EDTA und 0,5 % Triton-x-100 aufgenommen und homogenisiert. Abwechselnde Zentrifugation (30 Min bei 27.000 g, 4 °C) und Homogenisation des Pellets in 1 l 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5) und 20 mmol/l EDTA wurde noch dreimal durchgeführt.

Der t-PA-Gehalt der "refractile bodies" Präparationen wurde durch SDS-PAGE, Identifizierung der t-PA-Banden durch "Western-blotting" und densitometrische Analyse quantifiziert. Die "refractile bodies" zeigen bei SDS-PAGE und "Western-blotting" eine starke t-PA-Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Der t-PA-Anteil am Gesamtproteingehalt der "refractile

bodies" beträgt ca. 21 %.

b) Solubilisierung/Reduktion der "refractile bodies"

"Refractile bodies" wurden bei einer Proteinkonzentration von 1 bis 5 mg/ml in 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 8,6), 6 mol/l Guanidin-Hydrochlorid, 0,15 bis 0,4 mol/l DTE und 1 mmol/l EDTA 2 bis 3 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde unlösliches Material (Zellwandfragmente usw.) abzentrifugiert (z. B. 30 Min. bei 35.000 bis 50.000 g, 4 °C). Der pH-Wert des Überstandes wurde mit konz. HCl auf pH 3 eingestellt. Denaturierungs- und Reduktionsmittel wurden dann durch Dialyse gegen 0,01 mol/l HCl bei 4 °C abgetrennt.

c) Reoxidation/Aktivierung

Reoxidation/Aktivierung erfolgte durch eine 1:50 bis 1:200 Verdünnung in 0,1 mol/l Tris/HCl - (pH 10,5), 1 mmol/l EDTA, 1 mg/ml BSA, 0,5 mol/l L-Arginin, 2 mmol/l GSH, 0,2 mmol/l GSSG. Nach 17 bis 24 Stunden Aktivierung bei ca. 20 °C wurde die Aktivität und im Vergleich zur Aktivität von nativem glykosyliertem t-PA aus Eukaryonten die Ausbeute bestimmt.

Ausbeute bezogen auf den Gesamtproteingehalt der "refractile bodies": 2,5 +/- 0,5 %

Stimulierbarkeit : 10 +/- 5

Ausbeute bezogen auf den t-PA-Anteil der "refractile bodies": Ca. 12 %

d) Reoxidation/Aktivierung ohne Abtrennung der Denaturierungs-/Reduktionsmittel

"Refractile bodies" wurden bei einer Proteinkonzentration von 1,25 mg/ml in 0,1 mol/l Tris/HCl - (pH 8,6), 6 mol/l Guanidin-Hydrochlorid, 0,2 mol/l DTE und 1 mmol/l EDTA 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde sofort Reoxidation durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 mol/l Tris/HCl - (pH 10,5), 1 mmol/l EDTA, 1 mg/ml BSA, 0,3 mol/l L-Arginin und den in der Tabelle angegebenen Mengen an GSSG eingeleitet. Zusätzlich befand sich im Aktivierungsansatz eine Restkonzentration von 0,06 mol/l Guanidin-Hydrochlorid und 2 mmol/l DTE.

Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute von der GSSG-Konzentration bei Aktivierung ohne Abtrennung der Denaturierungs-/Reduktionsmittel.

GSSG (mmol/l)	Ausbeute' (%)	Stimulierbarkeit (Faktor)
0,2	0	—
1	0,13	4,0
5	1,49	7,4
6	1,28	5,4
7	1,04	5,8
9	0,98	5,2
10	1,77	10,0
15	0	—
20	0	—

' = Ausbeute an aktivem t-PA bezogen auf den Gesamtproteingehalt der "refractile bodies".

Beispiel 2

Eine RB ("refractile bodies")-Präparation (ca. 5 mg) wurde in 1 ml 0,1 mol/l Tris/HCl (pH = 8,6), 6 mol/l Guanidin-Hydrochlorid und 0,15 - 0,2 mol/l DTE 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliches Material (Zellwandfragmente usw.) wurde danach durch Zentrifugation (20 Minuten bei 17.000 g) abgetrennt. Denaturierungs- und Reduktionsmittel wurden durch Gelfiltration über Sephadex G 25 (superfine) in 0,01 mol/l HCl entfernt. Dabei wurde die Probe etwa um den Faktor 5 bis 10 verdünnt. Das reduzierte Material in 0,01 mol/l HCl wurde bei -20°C aufbewahrt.

Beispiel 3

In den nachfolgenden Tabellen ist der Einfluß verschiedener erfindungsgemäßer Parameter auf die Aktivierung und Stimulierbarkeit von t-PA zusammengestellt. Für diese Reoxidationsexperimente wurde das nach Beispiel 2 solubilisierete, reduzierte Protein nicht weiter vorgereinigt.

Das reduzierte Protein (in 0,01 mol/l HCl) wurde durch Verdünnung von 1:10 bis 1:500 in "Reoxidationspuffer" aktiviert. Die Aktivierung wurde nach 22 bis 48 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur bestimmt. Die Aktivität des reoxidierten Proteins bezieht sich auf eine "Standard-Reoxidation" (= 100%) in:

0,1 mol/l Tris/HCl (pH = 10,5) + 1 mmol/l EDTA

+ 0,5 mol/l L-Arginin

+ 1 mg/ml BSA

+ 0,5 mmol/l GSH (reduziertes Glutathion)

+ 0,5 mmol/l GSSG (Glutathiondisulfid).

Die Stimulierbarkeit errechnet sich aus $\Delta E_{\text{CNBrFSP}} / \Delta E_{\text{CNBrFSP}}$ (vgl. W. Nieuwenhuizen et al., Biochimica et Biophysica Acta **755** (1983) 531 bis 533). Die Aktivität (in Prozent) und die Stimulierbarkeit (Faktor) wurde nach J. H. Verheijen Thromb. Haemostas. **48**(3), 266-269, (1982) bestimmt.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:

1. Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom Zusatz an L-Arginin oder Guanidin-Hydrochlorid.

Reoxidation in 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 10,5)

+ 1 mmol/l EDTA

+ 1 mg/ml BSA

+ 0,5 mmol/l GSH

+ 0,5 mmol/l GSSG

a) L-Arginin

L-Arginin) (mol/l)	Aktivität (%)	Stimulierbarkeit (Faktor)
0	4	2,5
0,25	98	7,5
0,5	100	21,9
0,75	27	16,3
1,0	23	3,5

Bei diesem Experiment ist zu bedenken, daß t-PA durch L-Arginin, inhibiert wird. Der Abfall der Aktivierungsausbeute bei höheren L-Argininkonzentrationen ist deshalb bezüglich der Inhibition zu

korrigieren.

15

b) Guanidin-Hydrochlorid (Gdn/HCl)

(Gdn/HCl) (mol/l)	Aktivität (%)
0	11
0,25	22
0,5	53
0,75	58
1,0	12

2. Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute von Zusatz an Harnstoff und Harnstoffderivaten.

GSSG

35

a) Harnstoff

Reoxidation in 0,1 mol/l Tris (pH 10,5), 1 mmol/l EDTA, 1 mg/ml BSA, 5 mmol/l GSH, 0,2 mmol/l

40

Harnstoff (mol/l)	Aktivität (%)
0	1
0,5	20
1	59
1,5	126
2	162
2,5	141
3	72
4	12
5	0

b) Methylharnstoff

Methylharnstoff (mol/l)	Aktivität (%)
0,5	22
1	174
1,5	313
2	375
2,5	332
3	215
4	12
5	0

c) Ethylharnstoff

Ethylharnstoff (mol/l)	Aktivität (%)
0,5	46
1	212
1,5	323
2	300
2,5	107
3	19
4	0
5	0

d) Dimethylharnstoff

Dimethylharnstoff (mol/l)	Aktivität (%)	Stimulierbarkeit (Faktor)
0,5	167	8,8
1	256	8,9
1,5	283	9,4
2	177	7,7
2,5	78	8,9
3	23	9,9
4	4	8,6
5	2	3,5

3. Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom Zusatz an Fettsäureamiden:

50

Reoxidation in 0,1 mol/l Tris (pH 10,5), 1 mmol/l EDTA, 1 mg/ml BSA, 5 mmol/l GSH, 0,2 mmol/l GSSG.

3. Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom Zusatz an Fettsäureamiden:

Reoxidation in 0,1 mol/l Tris (pH 10,5), 1 mmol/l EDTA, 1 mg/ml BSA, 5 mmol/l GSH, 0,2 mmol/l GSSG.

a) Formamid

Formamid (mol/l)	Aktivität (%)
0	42
0,5	59
1	175
1,5	245
2	325
2,5	423
3	444
4	416
5	341

b) Methylformamid

Methylformamid (mol/l)	Aktivität (%)
0,5	100
1	135
1,5	304
2	389
2,5	466
3	452
4	425
5	121

c) Acetamid

Acetamid (mol/l)	Aktivität (%)
0,5	72
1	134
1,5	207
2	261
2,5	204
3	237
4	198
5	141

d) Propionamid

Propionamid (mol/l)	Aktivität (%)
0,5	95
1	99
1,5	197
2	150
2,5	101
3	39
4	2
5	0

e) Butyramid

Butyramid (mol/l)	Aktivität (%)
0,5	55
1	52
1,5	17
2	0

+ 0,5 mol/l L-Arginin

4. Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom pH-Wert.

30

+ 1 mg/ml BSAM

+ 0,5 mmol/l GSH

Reoxidation in 0,1 mol/l Tris/HCl + 1 mmol/l EDTA

+ 0,5 mmol/l GSSG

35

pH	Aktivität (%)	Stimulierbarkeit (Faktor)
7	1	-
8	22	3,0
9	89	13,6
10	105	20,3
11	95	21,3

50

+ 0,5 mol/l L-Arginin

5. Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute von der GSH/GSSG-Konzentration

+ 1 mg/ml BSA

Reoxidation in 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 10,5,

55

a) + 1 mmol/l GSH

+ 1 mmol/l EDTA

(GSSG) (mmol/l)	Aktivität (%)	Stimulierbarkeit (Faktor)
0,1	239	14,9
0,2	273	15,3
0,5	193	13,3
1	198	12,5
5	17	2,1
10	0	-
20	0	-

b) + 0,2 mmol/l GSSG

(GSH) (mmol/l)	Aktivität (%)	Stimulierbarkeit (Faktor)
0,05	15	2,2
0,1	40	3,8
0,2	112	6,8
0,5	142	7,4
1	273	6,8
5	260	7,9
10	143	6,3
20	55	5,1

6. Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute von der
Protein-Konzentration bei der Reoxidation
(Verdünnung 1:20 - 1:500)

Reoxidation in 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 10,5)

+ 1 mmol/l EDTA

+ 0,5 mol/l L-Arginin

+ 1 mg/ml BSA

+ 0,5 mmol/l GSH

+ 0,5 mmol/l GSSG

40

45

60

65

Verdünnung	Aktivität (%)	Stimulierbarkeit (Faktor)
1:10	29	15,3
1:20	45	25,4
1:50	69	37,9
1:100	100	37,9
1:200	79	52,7
1:500	29	28,7

7. Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom Zusatz an BSA

Reoxidation in 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 10,5)

+ 1 mmol/l EDTA

+ 0,5 mol L-Arginin

+ 0,5 mmol/l GSH

+ 0,5 mmol/l GSSG

20

25

BSA (mg/ml)	Aktivität (%)
0	47
0,5	83
1	100
3	102
5	52

Die Figuren 1 und 2 zeigen die Aktivität mit und ohne CNBr-FSP im Standardtest nach 17 Stunden Reoxidation bei Raumtemperatur in 0,1 mol/l Tris/HCl (pH = 10,5) + 1 mmol/l EDTA + 0,5 mol/l L-Arginin + 1 mg/ml BSA + 0,5 mmol/l GSH + 0,5 mmol/l GSSG. In den Fig. 1 und 2 bedeuten die Kurven (A) die Aktivität in Gegenwart von CNBr-FSP, die Kurven (B) die Aktivität ohne CNBr-FSP.

Beispiel 4

Aktivierung von t-PA über die gemischten Disulfide von t-PA und Glutathion.

Die verwendeten "refractile bodies" wurden nach einem der vorherigen Beispiele erhalten. Die Reduktion der "refractile bodies" wurde durch 2

40

Stunden Inkubation bei Raumtemperatur in 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,6, 1 mmol/l EDTA, 6 mol/l Gdn HCl, 0,2 mol/l DTE bei einer Proteinkonzentration von etwa 1 mg/ml durchgeführt.

45

Das gegen 0,01 mol/l HCl dialysierte, reduzierte Protein wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,1 mol/l Tris, pH 9,3, 9 mol/l Harnstoff und 0,2 mol/l GSSG verdünnt und 5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

50

Nach Ansäuern mit konz. HCl auf pH 3 folgte Dialyse gegen 0,01 mol/l HCl bei 4 °C. Nach der Dialyse betrug die Gesamtproteinkonzentration 0,33 mg/ml. Mit dem so präparierten t-PASSG wurden die optimalen Reaktivierungsbedingungen bestimmt.

55

a) pH-Optimum der Aktivierung von t-PASSG

Hier, wie in den folgenden Optimierungsexperimenten wurde (1) kein GSSG verwendet und (2) die Aktivierung nach 17 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur bestimmt. Aktivierung erfolgte

durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 mol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, 0,5 mol/l L-Arginin, 1 mg/ml BSA und 2 mmol/l GSH bei Variation des pH-Wertes.

5

pH	Ausbeute (%)	Stimulierbarkeit
6	0,04	3,3
6,5	0,37	9,5
7	1,35	11,4
7,5	5,66	7,1
8	7,32	8,2
8,5	8,65	7,0
9	8,59	8,7
9,5	8,32	11,7
10	6,15	12,5
10,5	3,07	11,2

Die Ausbeute wurde in % aktiver t-PA bezogen auf eingesetzte Proteinmenge bestimmt.

Ausbeuten beobachtet, die u.a. durch Schwankungen des Standard-t-PA's bedingt sind. Zur Verdeutlichung dieser Fehlerbreite sind alle Aktivierungsdaten nach 1:100 bzw. 1:200 Verdünnung in 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,5, 1 mmol/l EDTA, 0,5 mol/l L-Arginin, 1 mg/ml BSA und 2 mmol/l GSH zusammengefaßt.

25

b) Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Aktivierung von t-PASSG

Bei identischen Aktivierungsbedingungen werden bei verschiedenen Meßreihen unterschiedliche

30

Versuch	Ausbeute (%)	Stimulierbarkeit
1	8,65	7,0
2	4,47	9,3
3	4,49	9,7
4	8,50	6,5
5	3,45	17,2
6	4,32	8,3
7	3,29	14,0
8	3,54	13,4
9	5,07	16,4
Mittelwert	5,1 +/- 1,9	11,3 +/- 3,8

c) Stabilität des aktivierten Proteins

Aktivierung erfolgte in dem genannten Beispiel durch eine 1:200 Verdünnung in 0,1 mol/l Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,5 mol/l L-Arginin, 1 mg/ml BSA und 2 mmol/l GSH.

50

55

Zeit (h)	pH 9,5	
	Ausb. (%)	Stim.
1	0	-
6	0,89	15,5
23	2,43	23,1
47	2,83	23,6
71	2,62	21,5
215	2,21	22,6
239	2,28	14,3

Beispiel 5

Aktivierung von gentechnologisch hergestelltem Interferon- β .

"Refractile bodies" wurden nach den vorgenannten Methoden produziert. Die Reduktion/Solubilisierung der "refractile bodies" wurde wie folgt durchgeführt: Das Pellet wurde 3 Stunden bei 25 °C in 10 ml 9,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,8, 6 mol/l Gdn HCl, 1 mmol/l EDTA und 0,2 mol/l DTE inkubiert und nach 30 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 48.000 g der pH des Überstandes auf ca. 3 mit konzentrierter HCl eingestellt. An-

schließend wurde eine Gelfiltration über Sephadex G25 F in 0,01 mol/l HCl durchgeführt.

Das Eluat wurde auf Leitfähigkeit, Proteinkonzentration und Reaktivierbarkeit untersucht.

Die Aktivität des reoxidierten Proteins bezieht sich auf eine "Standardaktivierung" (= 100 %) in 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 10,5, mmol/l EDTA, 5 mmol/l GSH, 0,5 mmol/l GSSG und 0,25 mol/l L-Arginin.

a) Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute zum Zusatz an L-Arginin

Das Eluat wurde 1:50 mit 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,5, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l GSH, 0,5 mmol/l GSSG verdünnt und Stunden bei 0 °C aktiviert.

L-Arginin-Abhängigkeit der Aktivierung

L-Arginin (mol/l)	Aktivität (%)
0	8
0,25	8
0,5	15
0,75	15

b) Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom Zusatz an Harnstoff

Die Aktivierungslösung entsprach der von Punkt a); jedoch wurde 17 Stunden bei 0 °C aktiviert.

Harnstoff-Abhängigkeit der Aktivierung

Harnstoff (mol/l)	Aktivität (%)
0	13
0,5	100
1	200
1,5	100

c) Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom Zusatz an Formamid

Aktivierung wie in a); die Proben wurden nach 17 Stunden Aktivierung bei 0 °C untersucht.

Formamid-Abhängigkeit der Aktivierung

Formamid (mol/l) Aktivität

0	13
1	13
2	13
3	0
4	0

d) Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom Redoxpuffer

15

Das Eluat wurde 1:50 in 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,5, 1 mmol/l EDTA und 0,25 mol/l L-Arginin verdünnt und die Proben nach 17 Stunden Aktivierung bei 0 °C untersucht.

GSH/GSSG-Abhängigkeit der Aktivierung

20

GSH (mmol/l) GSSG (mmol/l) Aktivität (%)

1	0,5	6
5	0,5	13
10	0,5	25
20	0,5	25
5	0,1	13
5	0,5	13
5	1,0	13
5	5	6

35

e) Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom Zusatz von BSA

Das Eluat wurde 1:50 in 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,5, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l GSH, 0,5 mmol/l GSSG und 0,25 mol/l L-Arginin verdünnt und nach 17 Stunden Aktivierung bei 0 °C untersucht.

BSA-Abhängigkeit der Aktivierung

40

BSA (mg/ml) Aktivität (%)

0	13
1	13
2	25
5	13

f) Abhängigkeit der Aktivierungsausbeute vom pH

65

Das Eluat wurde 1:50 in 0,1 mol/l Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA, 5 mmol/l GSH, 0,5 mmol/l GSSG und 0,25 mol/l L-Arginin verdünnt und nach 17 Stunden Aktivierung bei 0 °C untersucht.

pH-Abhängigkeit der Aktivierung

pH	Aktivität (%)
6,5	0
7,5	6
8,5	13
9,5	50
10,5	100

Ansprüche

1. Verfahren zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten durch Zellaufschluß, Solubilisierung unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen und Reaktivierung unter oxidierenden Bedingungen in Gegenwart von GSH/GSSG, dadurch gekennzeichnet, daß man in der Stufe der Reaktivierung bei einem pH-Wert von 9 bis 12, einer GSH-Konzentration von 0,1 bis 20 mmol/l, einer GSSG-Konzentration von 0,01 bis 3 mmol/l und mit einer nicht denaturierenden Konzentration des Denaturierungsmittels arbeitet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß in der Reaktivierungsstufe der pH-Wert 9,5 bis 11 beträgt.

3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß in der Reaktivierungsstufe die GSH-Konzentration 0,2 bis 10 mol/l und/oder die GSSG-Konzentration 0,05 bis 1 mmol/l beträgt.

4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Solubilisierung und vor der Reaktivierung eine Reinigungsstufe durchführt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Reaktivierung ohne vorherige Abtrennung der Denaturierungs-/Reduktionsmittel durchgeführt wird, wobei die Reaktionslösung nach Denaturierung/Reduktion mit Reaktivierungspuffer verdünnt wird und bei der folgenden Reaktivierung die GSSG-Konzentration die verbleibende Restkonzentration an DTE übersteigt.

6. Abgeändertes Verfahren zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken aufweisenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten durch Zellaufschluß, Solubilisierung unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen, und Reaktivierung unter oxidierenden Bedingungen in Gegenwart von GSH, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reduktions-/Denaturierungsmittel abtrennt, durch

Zugabe von GSSG unter denaturierenden Bedingungen die Thiolgruppen der Proteine in die gemischten Disulfide von Protein und Glutathion überführt, in der Stufe der Reaktivierung bei einem pH-Wert von 7 bis 10,5 einer GSH-Konzentration von 0,5 bis 5 mmol/l und mit einer nicht denaturierenden Konzentration des Denaturierungsmittels arbeitet.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression in *E. coli* oder *P. putida* durchführt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man in der Reaktivierungsstufe als Denaturierungsmittel Arginin, Guanidinhydrochlorid und/oder wenigstens eine Verbindung der allgemeinen Formel $R_2\text{-CO-NRR}$, (I), in der R und R₁H oder Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen und R₂H oder NHR, oder Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen bedeutet, verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration an Arginin und/oder Guanidinhydrochlorid 0,1 bis 1,0 mol/l, insbesondere 0,25 bis 0,8 mol/l beträgt.

10. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration der Verbindung der allgemeinen Formel I 0,5 bis 4 mol/l, insbesondere 1 bis 3,5 Mol/l beträgt.

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man in der Stufe der Reaktivierung in Gegenwart eines nicht proteolytisch wirksamen Proteins, insbesondere in Gegenwart von Rinderserumalbumin, arbeitet.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man den Zellaufschluß mittels Ultraschall, Hochdruckdispersion oder Lysozym durchführt.

13. Verfahren nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß man den Aufschluß in einer verdünnten wässrigen Pufferlösung, insbesondere in 0,1 mol/l Tris, bei einem neutralen bis schwach sauren pH-Wert durchführt.

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Zellaufschluß die unlöslichen Bestandteile abtrennt.

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man in der Stufe der Solubilisierung bei einem alkalischen pH Wert in Gegenwart eines Reduktionsmittels aus der Mercaptogruppe und in Gegenwart eines Denaturierungsmittels arbeitet.

16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man in Gegenwart von Guanidinhydrochlorid und/oder Verbindung der allgemeinen Formel I als Denaturierungsmittel arbeitet.

17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration an Guanidinhydrochlorid 6 mol/l, die der Verbindung der allgemeinen Formel I 8 mol/l, beträgt.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man in Gegenwart von DTE, β -Mercaptoethanol, Cystein oder GSH arbeitet.

19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man Reinigung und Abtrennung von Reduktions-,

Oxidations- oder Denaturierungsmitteln mittels sterischer Ausschlußchromatographie oder Dialyse durchführt.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man nach der Stufe der Reaktivierung eine Reinigungsstufe mittels Dialyse durchführt.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche von 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als gentechnologisch hergestelltes eukaryontisches Protein t-PA verwendet.

22. Stimulierbarer nicht glycosylierter tPA, erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 21.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß man als gentechnologisch hergestelltes eukaryontisches Protein Interferon β verwendet.

24. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man das gemischte Disulfid von Protein und Glutathion durch Ionenaustauscherbehandlung vom nichtmodifizierten Protein abtrennt.

25

30

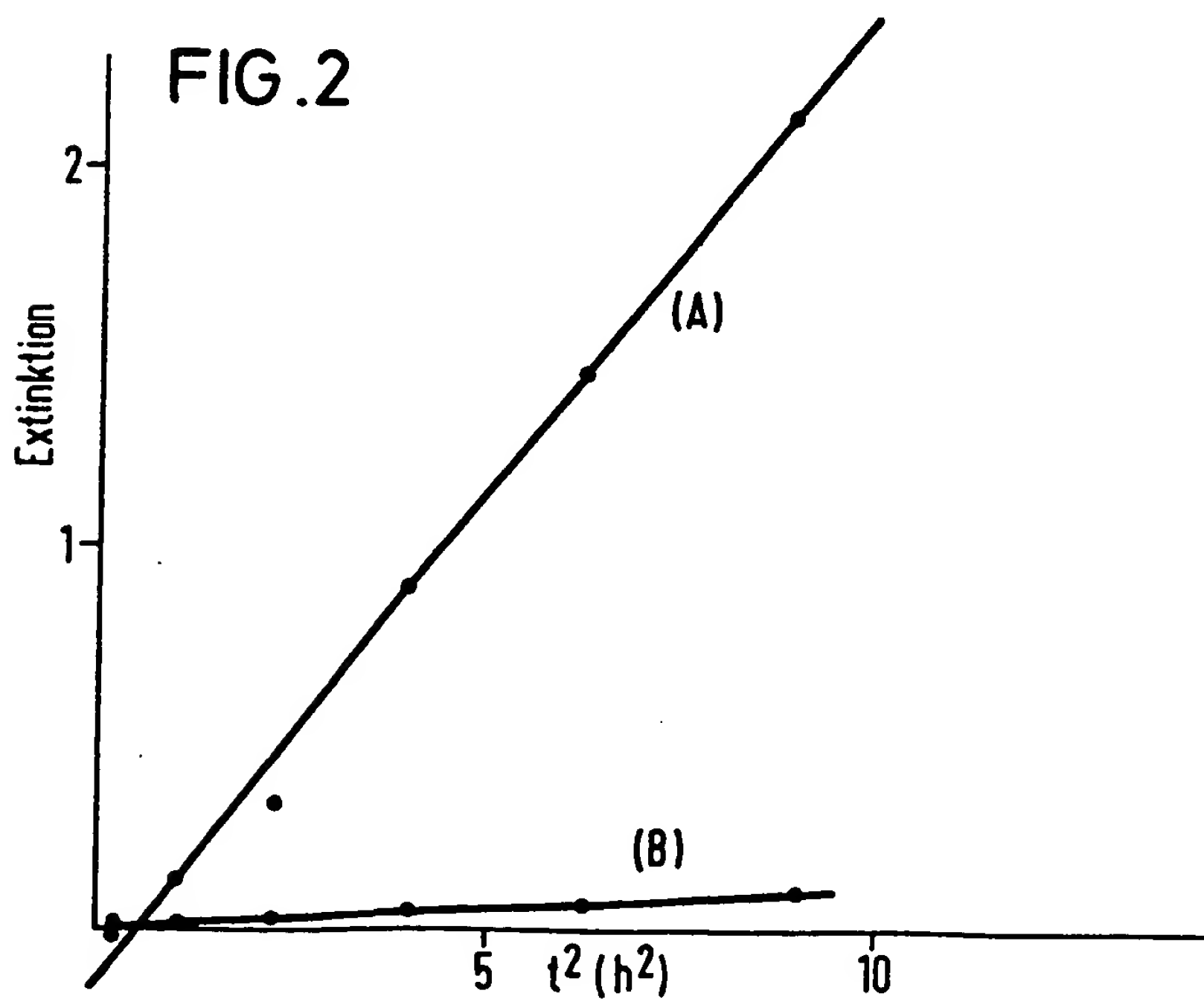
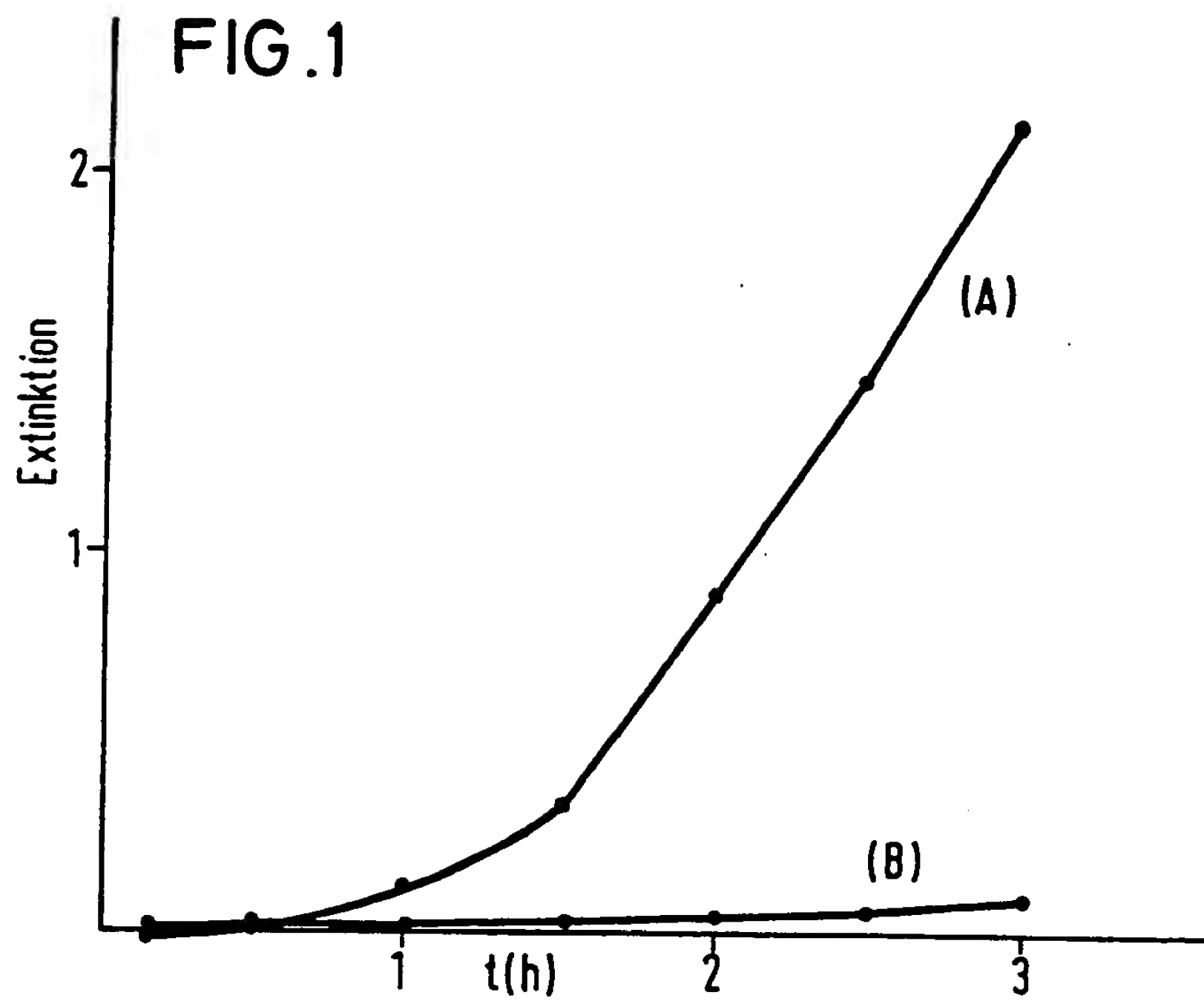
35

40

45

50

55





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 219 874 B1**

⑫

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

④ Veröffentlichungstag der Patentschrift: 15.12.93

⑤ Int. Cl. 5: **C07K 3/08, C07K 13/00,
C12P 21/02, C12N 9/72**

① Anmeldenummer: **86114731.2**

② Anmeldetag: **23.10.86**

Verbunden mit 86906320.6/0253823
(europäische
Anmeldenummer/Veröffentlichungsnummer)
durch Entscheidung vom 06.04.90.

Die Akte enthält technische Angaben, die nach
dem Eingang der Anmeldung eingereicht wurden
und die nicht in dieser Patentschrift enthalten sind.

⑤ Verfahren zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken
aufweisenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten.

③ Priorität: **23.10.85 DE 3537708**

④ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
29.04.87 Patentblatt 87/18

④ Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:
15.12.93 Patentblatt 93/50

④ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

⑤ Entgegenhaltungen:
**EP-A- 0 114 506
WO-A-84/03711
US-A- 4 530 787**

**THROMBOSIS AND HAEMASTASIA, 54(4),
788-791 (1985), D.C. RIJKEN et al.**

⑦ Patentinhaber: **BOEHRINGER MANNHEIM
GMBH**

D-68298 Mannheim(DE)

⑦ Erfinder: **Rudolph, Rainer, Dr.
Unterislinger Weg 21
D-8400 Regensburg(DE)
Erfinder: Fischer, Stephan, Dr.
Moosstrasse 27
D-8120 Weilheim(DE)
Erfinder: Mattes, Ralf, Dr.
Eyacher Strasse 37
D-8125 Oberhausen(DE)**

EP 0 219 874 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

METHODS IN ENZYMOLOGY, Band 107, Nr.19, 1984, pp. 305-329, Academic Press Inc. New York, London, T.E. CREIGHTON "Disulfide bond formation in proteins"

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 92, Nr.9, 3. März 1980, Seite 272, Ref. Nr. 71888f, Columbus, Ohio, US, K. MARTINEK et al. "Reactivation of "Irreversibly" denaturated enzymes"

BIOCHEMISTRY, Band 21, Nr.19, 1982, Seiten 4734-4740, Am.Chem.Soc. US, Y. KONISHI et al. "Regeneration of ribonuclease A from the reduced protein. Rate-limiting steps"

BIOCHEMISTRY, Band 19, Nr.18, 1980, Seiten 4166-4172, Am. Chem. Soc. US, A. MENEZ et al. "Refolding of reduced short neurotoxins : circular dichroism analysis"

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 92, Nr.1, 7. Januar 1980, Seite 233, Ref.Nr. 2302y, Columbus, Ohio, US; G. ZETTLMEISSEL et al. "Effects of low concentrations of guanidine hydrochloride on the reconstitution of lactic dehydrogenase from pig muscle in vitro"

HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM., Band 364, Juli 1983, Seiten 813-820, W. De Gruyter & Co, Berlin, DE; R. RUDOLPH et al. "Influence of glutathione on the reactivation of enzymes containing cysteine or cystine"

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 85, Nr.7, 16. August 1976, Seite 244, Ref.Nr. 42985k, Columbus, Ohio, US

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 96, Nr. 13, 29. März 1982, Seite 329, Ref. Nr. 99999z, Columbus, Ohio, US, J. TANG et al. "The enhancement of streptokinase activation of plasminogen by nonionic detergents and by serum albumin"

TEXAS REPORTS ON BIOLOGY AND MEDICINE, Band 41, 1981/82, Seiten 274-279, Univ. of Texas, Galveston, US; J.J. SEDMAK et al. "Approaches to the stabilization of Interferons"

⑦4 Vertreter: Welckmann, Heinrich, Dipl.-Ing. et al
Patentanwälte
H. Welckmann, Dr. K. Flincke
F.A. Welckmann, B. Huber
Dr. H. Liska, Dr. J. Prechtel, Dr. B. Böhm
Postfach 86 08
20
D-81635 München (DE)

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 103, Nr. 8, 26.
August 1985, Seite 349, Ref. Nr. 69305b, Co-
lumbus, Ohio, US

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 91, 1979, Seite
248, Ref.Nr. 34933a, Columbus, Ohio, US;
T.W. ODORZYNSKI et al.: "Refolding of the
mixed disulfide of bovine trypsinogen and
glutathione"

BIOCHEMISTRY, Band 7, Nr.12, Dezember
1968, Seiten 4247-4254, W.W.-C. CHAN "A
method for the complete S suffonation of
cysteine residues in proteins

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,
Band 258, Nr.19, 10. Oktober 1983, Seiten
11834-11839, US; J.P. PERRAUDIN et
al."Multiple parameter kinetic studies of the
oxidative folding of reduced lysozyme"

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 97, 1982, S.
304, Ref. Nr. 122934f, Columbus, Ohio, US;
C.T. DUDA et al.: "Refolding of bovine
threonine-neochymotrypsinogen"

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten.

Bei der Expression von heterologen Proteinen in Prokaryonten bilden diese Proteine in den Wirtszellen oft inaktive, schwer lösliche Aggregate (sog. "refractile bodies"), die außerdem noch mit Proteinen der Wirtszellen verunreinigt sind. Es wird vermutet, daß die Bildung solcher "refractile bodies" eine Folge der bei der Expression entstehenden hohen Proteinkonzentration in der Zelle ist. Es ist bekannt, daß bei der Bildung von großen Enzymmengen in der Zelle die Aggregation der Enzyme zu unlöslichen, hochmolekularen, meist inaktiven Partikeln erfolgt. Bevor solche Proteine, z. B. für therapeutische Zwecke, verwendet werden können, müssen sie demzufolge gereinigt und in ihre aktive Form überführt werden.

Nach bekannten Verfahren kann eine Reaktivierung derartiger, als Aggregate vorliegender Proteine in mehreren Schritten erfolgen (vgl. z. B. R. Jaenicke, FEBS Federation of European Biochemical Societies, Vol. 52 (1979) 187 bis 198; R. Rudolph et al., Biochemistry 18 (1979) 5572 bis 5575):

Im ersten Schritt wird eine Solubilisierung durch Zugabe von starken Denaturierungsmitteln, beispielsweise Guanidin-Hydrochlorid oder Harnstoff in hoher Konzentration oder durch Zugabe von stark sauren Agentien, beispielsweise Glycin/Phosphorsäure-Mischungen erreicht. Als weitere Hilfsstoffe haben sich reduzierende SH-Reagentien (z. B. Dithioerythritol, DTE) und EDTA, beispielsweise bei der Renaturierung von LDH, bewährt. Sofern das Protein durch Proteine der Wirtszelle verunreinigt ist, schließt sich als nächster Schritt eine Reinigung mit an sich bekannten und üblichen Methoden, z. B. Gel oder Ionenaustauschchromatographie, an. Anschließend wird stark verdünnt, damit die Konzentration des Denaturierungsmittels geringer wird. Bei Verwendung von Guanidin-Hydrochlorid wird dabei auf Werte unter 0,5 mol/l verdünnt. Bei Enzymen mit freien SH-Gruppen erwies sich die Zugabe von SH-Gruppen schützenden Agentien als vorteilhaft (vgl. z. B. R. Jaenicke, Journal Polymer Science, Part C 16 (1967) 2143 bis 2160).

In der EP-A-0114506 werden Verfahren zur Isolierung, Reinigung und Reaktivierung einiger heterologer Expressionsprodukte aus Bakterienkulturen beschrieben; zur Reaktivierung werden die Lösungen der "refractile bodies" in einem starken Denaturierungsmittel a) direkt in eine Lösung in einem schwächeren Denaturierungsmittel überführt, die dann zur Rückbildung von Disulfidbrücken oxydierenden Bedingungen unterworfen wird; b) das Protein sulfoniert, dann in eine Lösung in einem schwachen Denaturierungsmittel überführt und die S-Sulfonatgruppen durch Behandlung mit einem Sulfhydrylreagens in seiner reduzierten und oxydierten Form, z. B. mit GSH/GSSG, in -S-S-Gruppen überführt; oder c) die Lösung in einem schwachen Denaturierungsmittel direkt mit dem Sulfhydryl-Reagens, z. B. mit GSH/GSSG, behandelt. Ein typisches Beispiel, bei dem die oben dargelegten Probleme auftreten, ist t-PA.

In T. W. Odorzynski et al., 1979, The Journal of Biological Chemistry, 254 (10), 4291 - 4295 und in C. T. Duda et al., 1982, The Journal of Biological Chemistry, 257 (16), 9866 - 9871 werden verfahren zur Reaktivierung von natürlichen Proteinen, wie z. B. Trypsinogen, beschrieben.

Die Hauptkomponente der Proteinmatrix von geronnenem Blut ist polymeres Fibrin. Diese Proteinmatrix wird durch Plasmin gelöst, das aus Plasminogen über Aktivierung durch die sogenannten Plasminogen-Aktivatoren gebildet wird, z. B. durch t-PA (Gewebs-PlasminogenAktivator, tissue-type plasminogen activator). Die enzymatische Aktivität von natürlichem oder aus Eukaryonten gentechnologisch gewonnenem t-PA (katalytische Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin) ist in Abwesenheit von Fibrin oder Fibrinsspaltprodukten (FSP) sehr gering, kann aber in Gegenwart dieser Stimulatoren wesentlich gesteigert werden (um mehr als den Faktor 10). Diese sogenannte Stimulierbarkeit der Aktivität ist ein entscheidender Vorzug von t-PA gegenüber anderen bekannten Plasminogenaktivatoren, wie Urokinase oder Streptokinase (vgl. z. B. M. Hoylaerts et al., J. Biol. Chem. 257 (1982) 2912 bis 2919; Nieuwenhuizen et al., Biochemica et Biophysica Acta 755 (1983) 531 bis 533). Der Faktor der Stimulierbarkeit mit BrCN-Spaltprodukten wird daher in der Literatur verschiedentlich angegeben und mit bis zu 35 beziffert.

Ein t-PA-artiges, nicht glycosyliertes Produkt wird auch in genetisch manipulierten Prokaryonten (nach Einschleusen der c-DNA) gebildet; einem solchen Produkt kommt aber nicht die Stimulierbarkeit der Aktivität eines t-PA aus Eukaryonten zu. Denkbar ist, daß dies darauf zurückzuführen ist, daß die Redoxbedingungen in der Prokaryontenzelle in solcher Weise von der Eukaryontenzelle, aus der das Gen stammt, verschieden sind, daß von Anfang an ein nicht aktives Produkt gebildet wird, was beispielsweise darauf zurückzuführen sein könnte, daß die zahlreichen SS-Brücken, die das natürliche aktive Molekül enthält, in falscher Weise verknüpft oder gar nicht gebildet sind. Für den therapeutischen Einsatz von t-PA ist aber nicht nur die enzymatische Aktivität als solche erforderlich, sondern außerdem auch seine Stimulierbarkeit. Auf die Tatsache, daß die Prokaryontenzelle vermutlich nicht die richtigen Bedingungen schafft, um die Aktivität von Eukaryontenproteinen in der richtigen Weise auszubilden, wird für andere Substanzen in The EMBO Journal 4, Nr. 3 (1985) 775 bis 780 hingewiesen.

Nach der EP-A-0093639 werden zur Reaktivierung von t-PA die aus *E. coli* erhaltenen Zellpellets in 6 mol/l Guanidin-Hydrochlorid suspendiert, mit Ultraschall behandelt, inkubiert und anschließend vier Stunden gegen eine Lösung aus Tris-HCl (pH = 8,0), Natriumchlorid, EDTA und Tween 80 dialysiert. Nach Dialyse wird zentrifugiert, wobei im Überstand die Plasminogenaktivator-Aktivität zu finden ist. Auf diese Weise
 5 renaturierter t-PA ist zwar proteolytisch aktiv, zeigt jedoch keine meßbare Stimulierbarkeit durch BrCN-Spaltprodukte (BrCN-FSP) von Fibrin, gemäß dem in J. H. Verheijen, Thromb. Haemostas., 48, (3), 260 - 269 (1982) beschriebenen Verfahren.

Für die Reaktivierung von denaturierten Proteinen ist aus dem Stand der Technik kein allgemein anwendbares Verfahren bekannt; dies gilt ganz besonders für t-PA, weil das native Protein eine sehr
 10 komplexe Struktur besitzt; es enthält eine freie Thiolgruppe und 17 SS-Brücken, die theoretisch auf $2,2 \times 10^{20}$ verschiedene Weisen verknüpft werden können, wobei nur eine Struktur dem nativen Zustand entspricht. Die aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren zur Reaktivierung von t-PA führen zwar zu einem proteolytisch aktiven t-PA, der aber keine meßbare Stimulierbarkeit zeigt; ein Aktivierungsverfahren, welches zu stimulierbarem t-PA führt, ist nicht bekannt.

15 Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Bereitstellung eines Verfahrens zur vollständigen Aktivierung von gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteinen nach Expression in Prokaryonten; diese Aufgabe wird mit dem Gegenstand der vorliegenden Erfindung gelöst.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Aktivierung von durch Expression in Prokaryonten
 20 gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken aufweisenden eukaryontischen Proteinen durch

- a) Aufschließen der Prokaryontenzellen,
- b) Solubilisierung der eukaryontischen Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen,
- c) Abtrennung der Reduktions-/Denaturierungsmittel
- 25 d) Reaktivierung unter oxidierenden Bedingungen durch
- e) Überführung der Thiolgruppen der solubilisierten Proteine in die gemischten Disulfide von Protein und Glutathion durch Zugabe von GSSG unter denaturierenden Bedingungen,
- f) Bildung von aktivem Protein aus den gemischten Disulfiden bei einer GSH-Konzentration von 0,5 bis 5 mmol/l, einem pH-Wert von 7 bis 10,5 und in Gegenwart einer nicht denaturierenden Konzentration eines
 30 Denaturierungsmittels.

Bevorzugte Ausgestaltungen dieses Verfahrens sind Gegenstand der Unteransprüche.

Als Denaturierungsmittel kann in der Regel ein für Aktivierungen unter oxidierenden Bedingungen üblicherweise verwendetes Denaturierungsmittel oder Arginin eingesetzt werden; bevorzugt wird unter den bekannten Denaturierungsmitteln Guanidin-Hydrochlorid oder Harnstoff oder dessen Derivate verwendet.
 35 Außerdem hat sich Arginin als geeignet erwiesen. Ferner können Gemische dieser Denaturierungsmittel verwendet werden. Vorzugsweise wird diese Aktivierungsstufe auch in Gegenwart eines Fremdproteins durchgeführt; als solches eignet sich in der Regel jedes Fremdprotein, solange es nicht proteolytisch wirksam ist; vorzugsweise wird Rinderserumalbumin (BSA), verwendet, z.B. in einer Menge von 1 bis 3 mg/ml. Der Zusatz von BSA bewirkt eine leichte Erhöhung der Ausbeute und Stabilisierung des Proteins
 40 (wahrscheinlich durch Schutz vor Oberflächendenaturierung und/oder proteolytischem Abbau).

Die übrigen Verfahrensbedingungen können den für Reaktivierungsstufen aus dem Stand der Technik bekannten und üblichen Bedingungen entsprechen. Die Dauer der Aktivierung (Inkubation) beträgt vorzugsweise 20 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur. Bei einer längeren Inkubation (48 Stunden) unter Reoxidationsbedingungen nimmt die Stimulierbarkeit durch CNBr-FSP in der Regel ab. Die Aktivierungsstufe wird
 45 vorzugsweise in Gegenwart von EDTA durchgeführt, wobei die zweckmäßigste Konzentration ca. 1 mmol/l EDTA beträgt.

Die der Aktivierungsstufe (Reoxidation/Aktivierung) vorausgehenden und nachfolgenden Verfahrensschritte, wie Zellaufschluß, Solubilisierung (Solubilisierung/Reduktion) und gegebenenfalls eine oder mehrere der Aktivierungsstufe vorausgehende und/oder nachfolgende Reinigungsoperationen können nach aus
 50 dem Stand der Technik, z.B. aus der EP-A-0114506, EP-A-0093619, für derartige Verfahren bekannten und üblichen Methoden durchgeführt werden; für ein im Hinblick auf Ausbeute und Aktivierung optimales Ergebnis kann es aber zweckmäßig sein, einzelne oder alle Verfahrensschritte unter Berücksichtigung einer oder mehrerer der hier erläuterten Verfahrensausgestaltungen durchzuführen. Die Expression wird in Prokaryonten, vorzugsweise in *P. putida*, und insbesondere in *E. coli*, durchgeführt. Das erfindungsgemäße
 55 Verfahren ist jedoch genauso geeignet, wenn in anderen Prokaryonten (z.B. Bacilli) exprimiert wird.

Der Zellaufschluß kann durch hierfür übliche Methoden durchgeführt werden, z.B. mittels Ultraschall, Hochdruckdispersion oder Lysozym; er wird vorzugsweise in einer zur Einstellung eines neutralen bis schwach sauren pH-Wertes geeigneten Pufferlösung als Suspensionsmedium durchgeführt, wie z.B. in 0,1

mol/l Tris-HCl. Nach dem Zellaufschluß werden die unlöslichen Bestandteile ("refractile bodies") in beliebiger Weise abgetrennt, vorzugsweise durch Abzentrifugieren bei höheren g-Zahlen und längerer Zentrifugationszeit oder durch Filtration. Nach dem Waschen mit Agentien, die nicht stören, fremde Zellproteine jedoch möglichst lösen, z.B. Wasser, Phosphat-Pufferlösung, gegebenenfalls unter Zusatz milder Detergentien wie Triton, wird der Niederschlag (Pellet) der Solubilisierung (Solubilisierung/Reduktion) unterworfen. Die Solubilisierung erfolgt vorzugsweise im alkalischen pH-Bereich, insbesondere bei $\text{pH} = 8,6 \pm 0,4$ und in Gegenwart eines Reduktionsmittels aus der Mercaptangruppe und eines Denaturierungsmittels.

Als Denaturierungsmittel können die für Solubilisierungen aus dem Stand der Technik, z.B. aus der EP-A-0114506, bekannten und üblichen Denaturierungsmittel verwendet werden, und insbesondere Guanidin-Hydrochlorid oder Harnstoff. Die Konzentration an Guanidin-Hydrochlorid beträgt zweckmäßigerweise ca. 6 mol/l, die von Harnstoff ca. 8 mol/l. Ebenso können Verbindungen der allgemeinen Formel I eingesetzt werden.

Als Reduktionsmittel aus der Mercaptangruppe kann z.B. reduziertes Glutathion (GSH) oder 2-Mercapto-äthanol verwendet werden, z.B. in einer Konzentration von ca. 50 bis 400 mmol/l und/oder insbesondere DTE (Dithioerythritol) bzw. DTT (Dithiothreitol), z.B. in einer Konzentration von ca. 80 bis 400 mmol/l. Die Solubilisierung erfolgt zweckmäßigerweise bei Raumtemperatur während einer Dauer (Inkubation) von 1 bis mehreren Stunden, vorzugsweise von zwei Stunden. Zur Verhinderung der Autoxidation des Reduktionsmittels durch Luftsauerstoff kann es auch zweckmäßig sein, EDTA zuzusetzen. Neben der Solubilisierung/Reduktion hat die Solubilisierungsstufe auch einen Reinigungseffekt, da ein Großteil der Fremdproteine nicht in Lösung geht.

Nach der Solubilisierung erfolgt die Abtrennung der Reduktions- und der Denaturierungsmittel, eine unspezifische Reoxidation kann durch Zusatz eines Reduktionsmittels (z.B. 2-Mercaptoäthanol) oder durch pH-Werte 4,5 verhindert werden (vgl. z.B. R. Rudolph, Biochem. Soc. Transactions 13 (1985) 308 bis 311). Die Abtrennung der Denaturierungs-/Reduktionsmittel erfolgt durch Entsalzen über Sephadex G 25 in 0,01 mol/l HCl bzw. 0,1 mol/l Essigsäure. Die Abtrennung der Denaturierungs-/Reduktionsmittel ist alternativ durch Dialyse gegen die gleichen Lösungen möglich.

Ein weiterer Reinigungsschritt kann sich an die Reaktivierungsstufe anschließen; eine solche Reinigung erfolgt in der Regel mittels Dialyse, oder auch einer anschließenden Isolierung des aktivierten Proteins, beispielsweise durch Affinitätschromatographie, beispielsweise über Lys-Sephrose.

Die Bildung der gemischten Disulfide der gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken enthaltenden eukaryontischen Proteine mit Glutathion (im folgenden abgekürzt t-PASSG) erleichtert sowohl die Abtrennung von Fremdproteinen im denaturierten Zustand als auch die weitere Reinigung des nativen Proteins. Eine Reinigung nach Modifizierung der Thiolgruppen hat den Vorteil, daß das Protein geschützt gegen Luftoxidation und damit in einem größeren pH-Bereich stabil ist und eine Veränderung der Nettoladung die Reinigung erleichtert. Insbesondere kann durch Ionenaustauscherbehandlung eine Abtrennung vom nicht modifizierten Protein vorteilhaft durchgeführt werden.

Zur Bildung der gemischten Disulfide wird das dialysierte, reduzierte, von Denaturierungs- und Reduktionsmitteln gereinigte Protein mit einer ein Denaturierungsmittel enthaltenden, verdünnten, z.B. 0,2 mol/l, Lösung von GSSG inkubiert. Die Aktivierung erfolgt nach Abtrennung des Denaturierungs- und des Oxidationsmittels bei einem pH-Wert von 7 bis 10,5 einer GSH-Konzentration von 0,5 bis 5 mmol/l und mit einer nicht denaturierenden Konzentration des Denaturierungsmittels.

Das pH-Optimum liegt bei 8,5, die Ausbeute ist etwa doppelt so hoch wie bei einer Reaktivierung mit GSH/GSSG ohne gesonderte Bildung der gemischten Disulfide und das aktivierte Protein ist im Renaturierungspuffer über längere Zeit stabil.

Erfindungsgemäß gelingt es, t-PA aus Prokaryonten so zu aktivieren, daß nicht nur eine Aktivierung der normalen biologischen Aktivität erreicht, sondern darüberhinaus auch eine Stimulierbarkeit im oben definierten Sinne erreicht wird, welche die Stimulierbarkeit des nativen t-PA weit übersteigt und größer als Faktor 10 ist, ja sogar Faktor 50 übersteigen kann.

Ein weiteres eukaryontisches Protein, das erfindungsgemäß nach Expression in Prokaryonten aktiviert werden kann, ist β -Interferon.

Das nachfolgende Beispiel erläutert die Erfindung näher, ohne sie darauf zu beschränken. Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich Prozentangaben auf Gewichtsprozent, und Temperaturangaben auf Grad Celsius.

55 Beispiel

a) Präparation der "refractile bodies"

100 g E.coli Zellfeuchtmasse, aufgenommen in 1,5 l, 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5) und 20 mmol/l EDTA

wurden homogenisiert (Ultra-Turrax, 10 Sek.) und 0,25 mg/ml Lysozym zugegeben. Nach 30 Min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde erneut homogenisiert und auf 3°C abgekühlt. Der Zellaufschluß wurde durch Hochdruckdispersion (550 kg/cm²) erreicht. Anschließend wurde mit 300 ml 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5) und 20 mmol/l EDTA nachgespült. Nach Zentrifugation (2 Std. bei 27.000 g, 4°C) wurde das Pellet in 1,3 l 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5), 20 mmol/l EDTA und 2,5 % Triton-x-100 aufgenommen und homogenisiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 Min. bei 27.000 g, 4°C) wurde das Pellet in 1,3 l 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5), 20 mmol/l EDTA und 0,5 % Triton-x-100 aufgenommen und homogenisiert. Abwechselnde Zentrifugation (30 Min bei 27.000 g, 4°C) und Homogenisation des Pellets in 1 l 0,1 mol/l Tris/HCl (pH 6,5) und 20 mmol/l EDTA wurde noch dreimal durchgeführt.

Der t-PA-Gehalt der "refractile bodies" Präparationen wurde durch SDS-PAGE, Identifizierung der t-PA-Banden durch "Western-blotting" und densitometrische Analyse quantifiziert. Die "refractile bodies" zeigen bei SDS-PAGE und "Western-blotting" eine starke t-PA-Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Der t-PA-Anteil am Gesamtproteingehalt der "refractile bodies" beträgt ca. 21 %.

b) Aktivierung von t-PA über die gemischten Disulfide von t-PA und Glutathion.

Die verwendeten "refractile bodies" wurden nach a) erhalten. Die Reduktion der "refractile bodies" wurde durch 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur in 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,6, 1 mmol/l EDTA, 6 mol/l Gdn•HCl, 0,2 mol/l DTE bei einer Proteinkonzentration von etwa 1mg/ml durchgeführt.

Das gegen 0,01 mol/l HCl dialysierte, reduzierte Protein wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,1 mol/l Tris, pH 9,3, 9 mol/l Harnstoff und 0,2 mol/l GSSG verdünnt und 5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Ansäuern mit konz. HCl auf pH 3 folgte Dialyse gegen 0,01 mol/l HCl bei 4°C. Nach der Dialyse betrug die Gesamtproteinkonzentration 0,33 mg/ml. Mit dem so präparierten t-PASSG wurden die optimalen Reaktivierungsbedingungen bestimmt.

c) pH-Optimum der Aktivierung von t-PASSG

Hier, wie in den folgenden Optimierungsexperimenten wurde (1) kein GSSG verwendet und (2) die Aktivierung nach 17 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur bestimmt. Aktivierung erfolgte durch eine 1:100 Verdünnung in 0,1 mol/l Tris, 1 mmol/l EDTA, 0,5 mol/l L-Arginin, 1 mg/ml BSA und 2 mmol/l GSH bei Variation des pH-Wertes.

pH	Ausbeute (%)	Stimulierbarkeit
6	0,04	3,3
6,5	0,37	9,5
7	1,35	11,4
7,5	5,66	7,1
8	7,32	8,2
8,5	8,65	7,0
9	8,59	8,7
9,5	8,32	11,7
10	6,15	12,5
10,5	3,07	11,2

Die Ausbeute wurde in % aktiver t-PA bezogen auf eingesetzte Proteinmenge bestimmt.

d) Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der Aktivierung von t-PASSG

Bei identischen Aktivierungsbedingungen werden bei verschiedenen Meßreihen unterschiedliche Ausbeuten beobachtet, die u.a. durch Schwankungen des Standard-t-PA's bedingt sind. Zur Verdeutlichung dieser Fehlerbreite sind alle Aktivierungsdaten nach 1:100 bzw. 1:200 Verdünnung in 0,1 mol/l Tris/HCl, pH 8,5, 1 mmol/l EDTA, 0,5 mol/l L-Arginin, 1 mg/ml BSA und 2 mmol/l GSH zusammengefaßt.

Versuch	Ausbeute (%)	Stimulierbarkeit
1	8,65	7,0
2	4,47	9,3
3	4,49	9,7
4	8,50	6,5
5	3,45	17,2
6	4,32	8,3
7	3,29	14,0
8	3,54	13,4
9	5,07	16,4
Mittelwert	5,1 +/- 1,9	11,3 +/- 3,8

e) Stabilität des aktivierten Proteins

Aktivierung erfolgte in dem genannten Beispiel durch eine 1:200 Verdünnung in 0,1 mol/l Tris/HCl, 1 mmol/l EDTA, 0,5 mol/l L-Arginin, 1 mg/ml BSA und 2 mmol/l GSH.

Zeit (h)	pH 9,5	
	Ausb. (%)	Stim.
1	0	-
6	0,89	15,5
23	2,43	23,1
47	2,83	23,6
71	2,62	21,5
215	2,21	22,6
239	2,28	14,3

Patentansprüche

1. Verfahren zur Aktivierung von durch Expression in Prokaryonten gentechnologisch hergestellten, heterologen, Disulfidbrücken aufweisenden eukaryontischen Proteinen durch

a) Aufschließen der Prokaryontenzellen,

b) Solubilisierung der eukaryontischen Proteine unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen,

c) Abtrennung der Reduktions-/Denaturierungsmittel,

d) Reaktivierung unter oxidierenden Bedingungen durch

e) Überführung der Thiolgruppen der solubilisierten Proteine in die gemischten Disulfide von Protein und Glutathion durch Zugabe von GSSG unter denaturierenden Bedingungen,

f) Bildung von aktivem Protein aus den gemischten Disulfiden bei einer GSH-Konzentration von 0,5 bis 5 mmol/l, einem pH-Wert von 7 bis 10,5 und in Gegenwart einer nicht denaturierenden Konzentration eines Denaturierungsmittels.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet, daß man die Expression in *E. coli* oder *P. putida* durchführt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet, daß man in der Reaktivierungsstufe als Denaturierungsmittel Arginin, Guanidinhydrochlorid und/oder wenigstens eine Verbindung der allgemeinen Formel $R_2\text{-CO-NRR}_1$ (I), in der R und R_1 H oder Alkyl mit 1 bis 4 C-Atomen und R_2 H oder NHR_1 oder Alkyl mit 1 bis 3 C-Atomen bedeutet, verwendet.

4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentration an Arginin und/oder Guanidinhydrochlorid 0,1 bis 1,0 mol/l, insbesondere 0,25 bis 0,8 mol/l beträgt.

5. Verfahren nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration der Verbindung der allgemeinen Formel I 0,5 bis 4 mol/l, insbesondere 1 bis 3.5 Mol/l beträgt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man in der Stufe der Reaktivierung in Gegenwart eines nicht proteolytisch wirksamen Proteins, insbesondere in Gegenwart von Rinderserumalbumin, arbeitet.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den Zellaufschluß mittels Ultraschall, Hochdruckdispersion oder Lysozym durchführt.
8. Verfahren nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den Aufschluß in einer verdünnten wässrigen Pufferlösung, insbesondere in 0,1 mol/l Tris, bei einem neutralen bis schwach sauren pH-Wert durchführt.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man nach dem Zellaufschluß die unlöslichen Bestandteile abtrennt.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man in der Stufe der Solubilisierung bei einem alkalischen pH-Wert in Gegenwart eines Reduktionsmittels aus der Mercaptogruppe und in Gegenwart eines Denaturierungsmittels arbeitet.
11. Verfahren nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß man in Gegenwart von Guanidinhydrochlorid und/oder Verbindung der allgemeinen Formel I als Denaturierungsmittel arbeitet.
12. Verfahren nach Anspruch 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration an Guanidinhydrochlorid 6 mol/l, die der Verbindung der allgemeinen Formel I 8 mol/l, beträgt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß man in Gegenwart von DTE, β -Mercaptoethanol, Cystein oder GSH arbeitet.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Reinigung und Abtrennung von Reduktions-, Oxidations- oder Denaturierungsmitteln mittels sterischer Ausschlußchromatographie oder Dialyse durchführt.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, daß man nach der Stufe der Reaktivierung eine Reinigungsstufe mittels Dialyse durchführt.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche von 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als gentechnologisch hergestelltes eukaryontisches Protein t-PA verwendet.
17. Stimulierbarer nicht glycosylierter tPA, erhältlich nach dem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16.
18. Verfahren nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man das gemischte Disulfid von Protein und Glutathion durch Ionenaustauscherbehandlung vom nichtmodifizierten Protein abtrennt.

Claims

1. Process for the activation of heterologous, disulphide bridge-containing eukaryotic proteins produced gene-technologically by expression in prokaryotes by
 - a) digestion of the prokaryote cells,
 - b) solubilisation of the eukaryotic proteins under denaturing and reducing conditions,
 - c) separation of the reducing/denaturing agents,
 - d) reactivation under oxidising conditions by
 - e) conversion of the thiol groups of the solubilised proteins into the mixed disulphides of protein and glutathione by addition of GSSG under denaturing conditions,
 - f) formation of active protein from the mixed disulphides at a GSH concentration of 0.5 to 5 mmol/l, a pH value of 7 to 10.5 and in the presence of a non-denaturing concentration of a denaturing agent.

2. Process according to claim 1, characterised in that one carries out the expression in *E. coli* or *P. putida*.
3. Process according to claim 1 or 2, characterised in that, in the reactivation step, as denaturing agent,
5 one uses arginine, guanidine hydrochloride and/or at least one compound of the general formula $R_2\text{-CO-NRR}_1$ (I), in which R and R_1 signify H or alkyl with 4 C-atoms and R_2 signifies H or NHR_1 or alkyl with 1 to 3 C-atoms.
4. Process according to claim 3, characterised in that the concentration of arginine and/or guanidine
10 hydrochloride amounts to 0.1 to 1.0 mol/l, especially 0.25 to 0.8 mol/l.
5. Process according to claim 3, characterised in that the concentration of the compound of the general formula I amounts to 0.5 to 4 mol/l, especially 1 to 3.5 mol/l.
6. Process according to one of the preceding claims, characterised in that, in the step of reactivation, one
15 works in the presence of a non-proteolytically effective protein, especially in the presence of bovine serum albumin.
7. Process according to one of the preceding claims, characterised in that one carries out the cell
20 digestion by means of ultrasonics, high pressure dispersion or lysozyme.
8. Process according to claim 7, characterised in that one carries out the digestion in a dilute aqueous buffer solution, especially in 0.1 mol/l tris, at a neutral to weakly acidic pH value.
9. Process according to one of the preceding claims, characterised in that, after the cell digestion, one
25 separates off the insoluble components.
10. Process according to one of the preceding claims, characterised in that, in the step of solubilisation, one works at an alkaline pH value in the presence of a reducing agent of the mercapto group and in the
30 presence of a denaturing agent.
11. Process according to claim 10, characterised in that one works in the presence of guanidine hydrochloride and/or of the general formula I as denaturing agent.
12. Process according to claim 11, characterised in that the concentration of guanidine hydrochloride
35 amounts to 6 mol/l, that of the compound of the general formula I to 8 mol/l.
13. Process according to one of claims 10 to 12, characterised that one works in the presence of DTE, β -mercaptoethanol, cysteine or GSH.
40
14. Process according to one of the preceding claims, characterised in that one carries out purification and separation of reducing, oxidising and denaturing agents by means of steric exclusion chromatography or dialysis.
15. Process according to one of the preceding claims, characterised in that, after the step of reactivation,
45 one carries out a purification step by means of dialysis.
16. Process according to one of claims 1 to 15, characterised in that one uses t-PA as gene-technologically produced eukaryotic protein.
50
17. Stimulatable, non-glycosylated t-PA, obtainable according to the process according to one of claims 1 to 16.
18. Process according to claim 6, characterised in that one separates the mixed disulphide of protein and
55 glutathione from the non-modified protein by ion exchanger treatment.

Revendications

1. Procédé d'activation de protéines eucaryotiques hétérologues, comportant des ponts disulfures, préparées par génie génétique par expression dans des procaryotes, par
 - a) lyse des cellules procaryotiques,
 - b) solubilisation des protéines eucaryotiques dans des conditions dénaturantes et réductrices,
 - c) séparation des agents réducteurs/dénaturants,
 - d) réactivation dans des conditions oxydantes par
 - e) conversion des groupes thiols des protéines solubilisées en les disulfures mixtes de protéine et de glutathion par addition de GSSG dans des conditions dénaturantes,
 - f) formation de protéine active à partir des disulfures mixtes à une concentration en GSH de 0,5 à 5 mmol/l, un pH de 7 à 10,5 et en présence d'une concentration non dénaturante d'un agent dénaturant.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'on accomplit l'expression dans *E. coli* ou *P. putida*.
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'on utilise comme agent dénaturant dans l'étape de réactivation l'arginine, le chlorhydrate de guanidine et/ou au moins un composé de formule générale $R_2-CO-NRR_1$ (I), dans laquelle R et R_1 signifient H ou alkyle de 1 à 4 atomes de carbone et R_2 signifie H ou NHR_1 ou alkyle de 1 à 3 atomes de carbone.
4. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la concentration en arginine et/ou en chlorhydrate de guanidine est de 0,1 à 1,0 mol/l, en particulier de 0,25 à 0,8 mol/l.
5. Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la concentration du composé de formule générale I est de 0,5 à 4 mol/l, en particulier de 1 à 3,5 mol/l.
6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, dans l'étape de réactivation, on opère en présence d'une protéine non protéolytique, en particulier en présence de sérumalbumine bovine.
7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on accomplit la lyse des cellules au moyen d'ultrasons, par dispersion sous haute pression ou à l'aide de lysozyme.
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'on accomplit la lyse dans une solution tampon aqueuse diluée, en particulier dans du tris à 0,1 mol/l, à pH neutre à faiblement acide.
9. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on sépare les constituants insolubles après la lyse des cellules.
10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que, dans l'étape de solubilisation, on opère à pH alcalin en présence d'un agent réducteur du groupe des mercaptans et en présence d'un agent dénaturant.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que l'on opère en présence de chlorhydrate de guanidine et/ou d'un composé de formule générale I en tant qu'agent dénaturant.
12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que la concentration du chlorhydrate de guanidine est de 6 mol/l et la concentration du composé de formule générale I est de 8 mol/l.
13. Procédé selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que l'on opère en présence de DTE, de β -mercaptoéthanol, de cystéine ou de GSH.
14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on accomplit la purification et la séparation des agents réducteurs, oxydants ou dénaturants par chromatographie d'exclusion stérique ou par dialyse.

EP 0 219 874 B1

15. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'on réalise une étape de purification par dialyse après l'étape de réactivation.

5 16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'on utilise le t-PA comme protéine eucaryotique préparée par génie génétique.

17. T-PA non glycosylé stimuable qui peut être obtenu par le procédé selon l'une des revendications 1 à 16.

10 18. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'on sépare par traitement sur échangeur d'ions le disulfure mixte de protéine et de glutathion de la protéine non modifiée.

15

20

25

30

35

40

45

50

55